



MAÍRA RESENDE

**DESEMPENHO E SAÚDE INTESTINAL DE LEITÕES
SUPLEMENTADOS COM DL OU L-METIONINA NA FASE
DE CRECHE**

**LAVRAS-MG
2017**

MAÍRA RESENDE

**DESEMPENHO E SAÚDE INTESTINAL DE LEITÕES SUPLEMENTADOS COM
DL OU L-METIONINA NA FASE DE CRECHE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na área de Produção e Nutrição de Monogástricos, para a obtenção do título de Mestre.

Prof. Dr. Vinícius de Souza Cantarelli
Orientador

Prof. Dr. Márvio Lobão Teixeira de Abreu
Coorientador

Prof. Dr. Rony Antonio Ferreira
Coorientador

**LAVRAS-MG
2017**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Resende, Maíra .

Desempenho e saúde intestinal de leitões suplementados com
DL ou L-metionina na fase de creche / Maíra Resende. - 2016.
41 p.

Orientador(a): Vinícius de Souza Cantarelli.

Coorientador(a): Márvio Lobão Teixeira de Abreu, Rony
Antonio Ferreira.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Bibliografia.

1. Leitões. 2. Saúde intestinal. 3. Desempenho. I. Cantarelli,
Vinícius de Souza. II. Abreu, Márvio Lobão Teixeira de. III.
Ferreira, Rony Antonio. IV. Título.

MAÍRA RESENDE

**DESEMPENHO E SAÚDE INTESTINAL DE LEITÕES SUPLEMENTADOS COM
DL OU L-METIONINA NA FASE DE CRECHE**

**GROWTH PERFORMANCE AND INTESTINAL HEALTH OF PIGLETS
SUPPLEMENTED WITH DL OR L-METHIONINE IN THE NURSERY PHASE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na área de Produção e Nutrição de Monogástricos, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 28 de outubro de 2016

Prof. Dr. Luciano Hauschild UNESP – Jaboticabal

Prof. Dr. Márvio Lobão Teixeira de Abreu UFLA

Prof. Dr. Rony Antonio Ferreira UFLA

Prof. Dr. Vinícius de Souza Cantarelli
Orientador

**LAVRAS-MG
2017**

Aos meus pais, meus pilares!

Ao meu grande companheiro e incentivador, Rhuan!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus, Aquele que caminha comigo, me guiando sempre para o melhor caminho.

À Universidade Federal de Lavras pela oportunidade concedida.

Ao Departamento de Zootecnia pelo aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, Professor Vinícius de Souza Cantarelli, pelas experiências compartilhadas e pela confiança depositada.

Aos Professores Márvio Lobão Teixeira de Abreu e Rony Antonio Ferreira, pelo apoio como coorientadores, e ao Professor Luciano Hauschild pelo pela disponibilidade.

Aos funcionários do Centro Experimental de Suínos e do Laboratório de Pesquisa Animal pelo auxílio na condução do experimento.

Às minhas colegas de pós-graduação, Carol e Letícia, pelos dias de trabalhos e risadas.

Ao meu colega de trabalho Gustavo Gattás, primeiro a me incentivar neste projeto.

Aos meus pais e irmãs, que mesmo distantes fisicamente, se faziam sempre presentes.

Ao meu amor, Rhuan, pelo carinho, e principalmente, pela paciência. Me faltam palavras para descrever o quanto o seu apoio me fez mais forte!

E, especialmente, ao Núcleo de Estudos em Suinocultura (NESUI), pois sem vocês esse trabalho não seria possível. Pelas amizades conquistadas e experiências compartilhadas!

*“Insanidade é continuar fazendo sempre a mesma coisa
e esperar resultados diferentes.”*

Albert Einstein

RESUMO

A metionina (Met) é um aminoácido essencial e geralmente o segundo ou terceiro aminoácido limitante em dietas convencionais para suínos. Possui função direta na síntese de proteínas, assim como em outras funções biológicas, importantes para o desempenho e a saúde dos animais. O trabalho foi realizado com o objetivo de investigar o desempenho e a saúde intestinal de leitões suplementados com L-Metionina (L-Met) em comparação com a DL-Metionina (DL-Met) na fase de creche. Foram utilizados 72 suínos (machos castrados e fêmeas) de alto valor genético, com peso inicial de $6,30 \pm 0,81$ kg e 25 dias de idade (4 dias pós-desmame), distribuídos aleatoriamente em 3 tratamentos, por 42 dias: Dieta basal deficiente em Met (DB), DB + 0,06% de DL-Met e DB + 0,06% de L-Met. A DB atendeu 66% da exigência de Met na fase pré-inicial e 71% na inicial, segundo o NRC (2012). As dietas DL-Met e L-Met atenderam 88% (pré-inicial) e 95% (inicial) das exigências de metionina. Os animais foram pesados individualmente e o fornecimento de ração mensurado por baia diariamente, com o objetivo de calcular as variáveis de desempenho consumo de ração diário (CRD), ganho de peso diário (GPD), conversão alimentar (CA) e peso final (PF), considerando os valores de sobras de ração. Diariamente foi avaliada a incidência de diarreia, calculada através da porcentagem de baias com animais positivos para diarreia em relação ao total de observações realizadas no período. Aos 42 dias de ensaio, um macho castrado por parcela experimental foi abatido e segmentos de jejuno foram coletados para avaliação da morfologia intestinal. Aos 43 dias amostras de sangue do macho restante da parcela foram coletadas para avaliação da ureia plasmática. Do 0 aos 28 dias de avaliação, a suplementação com L-Met aumentou o PF e o GPD, quando comparados com a DB. Ao final dos 42 dias, os animais suplementados com DL-Met tiveram melhor GPD do que os animais que receberam a DB. Além disso, houve uma tendência de melhora no PF ($P = 0,065$), sendo que os animais do grupo DL-Met e L-Met tiveram um peso 4,85 e 6,63% maior do que o grupo DB, respectivamente. Do 0 aos 35 dias, os animais suplementados com L-Met apresentaram uma menor incidência de diarreia, quando comparados com os grupos DB e DL-Met. Já no período total, o grupo L-Met apresentou menor incidência do que o grupo DL-Met. Os resultados de ureia plasmática e altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo:cripta do jejuno não foram diferentes entre os tratamentos. Como conclusão, a suplementação com L-Met aumenta o ganho de peso diário até os 28 dias de creche e a de DL-Met até os 42 dias de creche. A suplementação com L-Met reduz a incidência de diarreia durante a fase de creche.

Palavras-chave: Desempenho. Leitões. Metionina. Saúde intestinal.

ABSTRACT

Methionine (Met) is an essential amino acid and usually the second or third limiting amino acid in conventional swine diets. It has a direct function in the synthesis of proteins, as well as in other biological functions, important for the performance and the health of the animals. The aim of this study was to investigate the performance and intestinal health of piglets supplemented with L-Methionine (L-Met) compared to DL-Methionine (DL-Met) in the nursery phase. Seventy-two pigs (barrows and gilts) of high genetic value, with initial BW of 6.30 ± 0.81 kg and 25 days of age (4 days post-weaning), were randomly in three treatments for 42 days: Basal diet deficient in Met (DB), DB + 0.06% of DL-Met and DB + 0.06% L-Met. DB meeting 66% of the requirement of methionine in pre-starter phase and 71% in starter phase, according NRC (2012). DLM diets and LM meeting 88% (pre-starter) and 95% (starter) of requirement. The animals were weighed individually and the supply of feed per pen measured daily, for to calculate the final BW, average daily gain (ADG), daily feed intake (ADFI) and feed conversion (FCR), considering the amounts of feed leftovers. Daily incidence of diarrhea was performed, calculated using the percentage of positive pens for diarrhea over the total period of observations carried out. At 42 days of trial, a barrow per pen was slaughtered and jejunum segments were collected for evaluation of intestinal morphology. At 43 days blood samples from the remaining barrow of the pen were collected for evaluation of plasma urea. From 0 to 28 d of evaluation, L-Met supplementation increased final BW and ADG when compared to DB. At the end of 42 days, animals supplemented with DL-Met had better ADG than animals receiving DB. In addition, there was a trend of improvement in the final BW ($P = 0.065$) and the animals of the DL-Met and L-Met groups had a BW 4.85 and 6.63% higher than the DB group, respectively. From 0 to 35 days, animals supplemented with L-Met had a lower incidence of diarrhea when compared to DB and DL-Met groups. In the total period, the L-Met group presented lower incidence than the DL-Met group. The results of PUN and villus height, crypt depth and villous:crypt jejunum were not different between treatments. In conclusion, L-Met supplementation increases the average daily gain at 28 days of nursery phase and DL-Met at 42 days of nursery phase. L-Met supplementation reduces the incidence of diarrhea during the nursery phase.

Keywords: Growth performance. Gut health. Piglets. Methionine.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dietas basais nas fases pré-inicial e inicial	27
Tabela 2 – Temperaturas mínima e máxima, em °C, durante o estudo na fase de creche	30
Tabela 3 – Peso final (PF), ganho de peso diário (GPD), consumo de ração diário (CRD) e conversão alimentar (CA) de leitões suplementados com DL-Met e L-Met na fase de creche, comparados a uma dieta basal	31
Tabela 4 – Incidência de diarreia (ID), em %, de leitões suplementados com DL-Met e L-Met na fase de creche, comparados a uma dieta basal.....	32
Tabela 5 – Ureia plasmática, em mg/dL, de leitões suplementados com DL-Met e L-Met na fase de creche, comparados a dieta basal	32
Tabela 6 – Morfometria do jejuno, em µm, de leitões suplementados com DL-Met e L-Met na fase de creche, comparados a dieta basal	33

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE	
1	INTRODUÇÃO 11
2	REFERENCIAL TEÓRICO
2.1	Aminoácidos 13
2.2	Metionina 14
2.3	Fontes de metionina 15
2.4	Metabolismo da metionina 16
2.5	Metabolismo da metionina no intestino delgado 17
3	CONSIDERAÇÕES GERAIS 18
	REFERÊNCIAS 19
	SEGUNDA PARTE – ARTIGO 22
	ARTIGO 1 - DESEMPENHO E SAÚDE INTESTINAL DE LEITÕES SUPLEMENTADOS COM DL E L-METIONINA EM SUÍNOS NA FASE DE CRECHE
	INTRODUÇÃO 25
1	MATERIAL E MÉTODOS
1.1	Animais, instalações e delineamento experimental 26
1.2	Dietas experimentais 26
1.3	Procedimentos experimentais 28
1.4	Colheita de amostras e processamentos 28
1.5	Morfologia intestinal 28
1.6	Ureia plásmatica 29
2	RESULTADOS
2.1	Desempenho 30
2.2	Incidência de diarreia 32
2.3	Ureia plasmática 32
2.4	Morfologia intestinal 32
3	DISCUSSÃO 34
4	CONCLUSÕES 37
	REFERÊNCIAS 38

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

Na busca do máximo desempenho do suíno é de fundamental importância atuar sobre os pontos críticos existentes na fase de creche, principalmente nos primeiros dias de alojamento. Este período é determinante, já que o ganho de peso na primeira semana de creche está diretamente relacionado com a idade ao abate, sendo que, quanto maior o ganho neste período, menos tempo para atingir o peso de abate.

Vários autores relatam efeitos negativos na integridade intestinal dos leitões após as condições impostas pelo desmame, sendo comum observar diminuição na altura das vilosidades e redução na atividade de enzimas. Com a mucosa intestinal alterada, a digestão e absorção dos nutrientes tornam-se prejudicadas. Por esta razão, a utilização de nutrientes com ação funcional celular se torna necessária, trazendo diversas vantagens para o desempenho dos animais.

A metionina (Met) é um aminoácido (AA) essencial que desempenha papéis únicos, tanto na estrutura como no metabolismo da proteína. É reconhecida por exercer outras importantes funções, uma vez que é precursora de moléculas essenciais, tais como cisteína (Cis), S-adenosilmetionina (SAM), poliaminas e a enzima glutathione peroxidase (GSH), que participa na regulação do epitélio intestinal em situações de estresses oxidativos, contribuindo positivamente para o crescimento da mucosa intestinal e a manutenção da sua função.

A síntese de proteínas, e conseqüentemente o desempenho, são afetados quando a Met é fornecida em níveis insuficientes. Além disso, a deficiência de Met e Cis suprime significativamente a proliferação de células do epitélio intestinal dos animais.

A Met é geralmente o segundo ou terceiro AA limitante em dietas convencionais para suínos. Por isso, o balanceamento da dieta com fontes de Met suplementares, a fim de gerar níveis adequados deste AA é uma prática comum. Entre as principais fontes utilizadas está a DL-Met (99% de pureza), no entanto apenas a L-Met (99% de pureza) possui a configuração necessária para a síntese de proteínas, ativação celular e regulação metabólica. Os suínos convertem o isômero D-Metionina (D-Met) a L-Met com bastante eficiência (Baker, 2006), entretanto, como esta conversão acontece basicamente no fígado e nos rins (D'Aniello et al., 1990; Fang et al., 2010), a D-Met não é usada diretamente pelas células intestinais.

Com isso, o objetivo com este trabalho foi investigar o desempenho e a incidência de diarreia, morfometria e ureia plasmática de leitões suplementados com L-Met em comparação com a DL-Met na fase de creche.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aminoácidos

Os AA são definidos como compostos orgânicos simples, contendo tanto um grupo carboxilo quanto um grupo amino, que pode estar ligado aos diferentes átomos de carbono da molécula (WU, 2009, p. 1; WU, 2013, p. 1).

Existem mais de 700 AA na natureza, mas apenas 20 deles servem como blocos de construção das proteínas (WU, 2013, p. 5; WU et al., 2014). Estes podem ser classificados como essenciais (AAE), não essenciais (AANE) ou condicionalmente essenciais para os animais. Um AANE pode ser sintetizado no corpo e não são necessárias suplementações na dieta. Por outro lado, os AAE devem ser complementados na dieta, pois eles não podem ser sintetizados ou são sintetizados de forma insuficiente para satisfazer a sua necessidade adequada. Na nutrição suína, existem nove AA classificados como essenciais: histidina (His), isoleucina (Ile), leucina (Leu), lisina (Lis), Met, fenilalanina (Fen), treonina (Tre), triptofano (Tri) e valina (Val). O AANE são a alanina (Ala), a asparagina (Asn), o aspartato (Asp), o glutamato (Glu), a glicina (Gli) e a serina (Ser). Já os AA condicionalmente essenciais são a arginina (Arg), a Cis, a glutamina (Gln), a prolina (Pro) e a tirosina (Tir) (WU et al., 2014; NRC, 2012, p. 15). Eles desempenham papéis importantes na expressão de genes, na sinalização celular, em respostas antioxidativas e até mesmo na resposta imune do animal (WU et al., 2010).

Entre os AAE, existem dois que podem ser convertidos em AANE: a Met e a Fen, convertidos em Cis e Tir, respectivamente. Tal fato acontece quando estes AA estão em excesso no corpo, mas não vice-versa, o que significa que Met e Fen precisam ser sempre suplementados na dieta (WU et al., 2014).

Exceto para a glicina, AA mais simples em natureza, todos os outros tem pelo menos um átomo de carbono assimétrico e exibem atividade óptica ou polarização rotativa (WU, 2013, p. 3). As configurações absolutas do AA (L ou D-isômeros) são especificadas baseadas na configuração do gliceraldeído, como introduzido por Emil Fischer em 1908 (NELSON; COX, 2004). Os L-AA são os isômeros fisiologicamente predominantes, pois quase todos os AA livres ou ligados à proteína (exceto a glicina) têm a configuração absoluta de L-gliceraldeído (WU, 2013, p. 4). Além disso, todos os AA usados na síntese proteica estão em sua forma de L-AA. Sendo assim, dois

passos são essenciais para a utilização dos D-AA: o D-isómero deve ser submetido a uma desaminação oxidativa para um alfa-acetoácido correspondente e este análogo deve, em seguida, submeter-se a uma transaminação específica por meio de uma reação aminotransferase apropriada (D'MELLO, 2003, p. 4).

O principal papel do AA é atuar como um bloco de construção na síntese de proteínas teciduais e substâncias metabólicas (WU, 2013, p. 5). Os AA também estão envolvidos na sinalização celular e na regulação metabólica, bem como na imunidade, crescimento e desenvolvimento, lactação, reprodução e, ganham assim, a classificação de aminoácidos funcionais (AAF) (WU, 2010, p. 1). Alguns aminoácidos são importantes precursores de neurotransmissores e certos hormônios, enquanto outros estão envolvidos no transporte de nitrogênio e na manutenção da integridade das membranas celulares (D'MELLO, 2003, p. 9).

2.2 Metionina

A Met, assim como a Cis, é um aminoácido sulfurado (SAA), com importantes funções metabólicas e uma participação ativa na síntese proteica (BAUCHART-THEVRET; STOLL; BURRIN, 2009). É a precursora da Cis, um AANE, produzido através da via de transulfuração da Met (FINKELSTEIN, 1990, p. 1; WU et al., 2014).

Em complemento a sua função primária como componente de proteínas, a Met é fundamental em alguns processos metabólicos como a metilação do DNA e a síntese de carnitina a partir da lisina, adrenalina a partir da noradrenalina e a creatinina a partir do acetato de guanidina, por isso conhecida como “doadora do grupo metil” (LEWIS, 2003, p. 151). A Met também tem um papel único na iniciação da síntese proteica, já que sua natureza hidrofóbica é essencial para a ligação do RNA transportador no complexo de pré-iniciação (BROSNAN et al., 2007). Dietas deficientes em Met resultam em um pior desempenho (SHEN et al., 2014) e uma menor resposta imune (LITVAK et al., 2013). A estimulação do sistema imune aumenta a exigência de metionina para sua manutenção, o que deve ser considerado nas formulações de dietas (RAKHSHANDEH et al., 2014).

A Met e a Cis estão diretamente envolvidas na regulação da GSH, uma enzima antioxidante, que age impedindo e controlando a formação de radicais livres, envolvidos na ocorrência de danos oxidativos (BARBOSA et al., 2010). Em fêmeas suínas, a GSH contribui para a melhoria das

condições de ovulação através do controle do estresse oxidativo (LE FLOCH et al., 2012) e em leitões desmamados, a Met mantém a integridade e a função de barreira da mucosa do intestino delgado (CHEN et al., 2014).

2.3 Fontes de metionina

Quando os aminoácidos dietéticos não são suficientes para satisfazer as exigências de proteínas e AA, o desempenho do animal é restringido ou a saúde e a imunidade podem ser prejudicadas (WU, 2010, p. 1). O AA que está presente na menor quantidade em relação ao seu requisito é chamado de primeiro AA limitante. O primeiro AA limitante varia dependendo do ingrediente principal de alimentação, digestibilidade da dieta, sexo, peso corporal e estado fisiológico do animal (CROMWELL, 2004) e a suplementação destes AA deve acontecer na sequência de sua limitação (BERTECHINI, 2006, p. 108).

A adição de aminoácidos industriais nas dietas para suínos é uma prática nutricional bastante utilizada, com o objetivo de potencializar o desempenho e minimizar os impactos ambientais causados pela excreção de nitrogênio. As principais fontes de Met incluem a DL-Met, com 99% de pureza, e a MHA (metionina análogo ácido livre), com 88% de atividade de metionina (HOEHLER; RADEMACHER; MOSENTHIN, 2005; KONG et al., 2016; TIAN et al., 2016). Atualmente a L-Met (99% de pureza) também tem sido uma opção.

Os suínos convertem o isômero D-Met a L-Met com bastante eficiência (BAKER, 2006), no entanto, esta conversão acontece basicamente no fígado e nos rins (D'ANIELLO et al., 1990; FANG et al., 2010). É um processo que requer duas fases e a enzima limitante é a D-AA oxidase (CHUNG; BAKER, 1992). Leitões jovens possuem uma produção menor de D-AA oxidase, tornando a transaminação ineficiente e reduzindo a biodisponibilidade da D-Met (D'ANIELLO et al., 1993).

Embora numerosos estudos já tenham realizados para comparar a eficácia da MHA e da L-Met em relação ao DL-Met, os resultados de vários destes trabalhos têm sido inconclusivos ou parecem ser inconsistentes devido a diferenças na idade do animal, duração do ensaio, composição das dietas experimentais, grau de deficiência da Met, ou simplesmente, devido a uma falta de sensibilidade dos respectivos ensaios (HOEHLER; RADEMACHER; MOSENTHIN, 2005).

2.4 Metabolismo da metionina

As proteínas dietéticas são hidrolisadas em pequenos peptídeos e AA livres no trato digestório antes que eles sejam transportados através dos enterócitos (WU et al., 2014). Este processo, definido como digestão, depende de proteases e peptidases presentes no lúmen. A absorção refere-se ao movimento dos produtos da digestão a partir do lúmen intestinal para a mucosa intestinal. Posteriormente, alguns produtos da digestão de proteínas são amplamente metabolizados pela mucosa, ao passo que outros são rapidamente transferidos para o sistema vascular para utilização pelo corpo (WU, 2013, p. 35).

A transmetilação, remetilação e a transulfuração são as principais vias de metabolização da Met (FINKELSTEIN, 1990, p. 1). A transmetilação, ou seja, a doação do grupo metil da Met a homocisteína, acontece via SAM, um cofator enzimático. A SAM também é uma fonte de grupos metileno (para a síntese de ácidos gordos de ciclopropilo), grupos amino (na síntese da biotina) e grupos aminopropilo (síntese de poliaminas)(BROSNAN et al., 2007). O processo da transmetilação envolve o gasto energético da ativação da Met à SAM através da Met adenosiltransferase (MAT), seguida pela transferência do grupo metil por uma metiltransferase. A transmetilação é completada por uma hidrólise reversível da SAM a uma adenosina e uma homocisteína. O destino metabólico de homocisteína depende do tecido no qual se encontra, assim como o estado metabólico do animal (BROSNAN; BROSNAN, 2006).

A Met sintase é a enzima envolvida diretamente na remetilação da homocisteína à Met. A remetilação também pode ser efetuada pela betaína, através da homocisteína metiltransferase. Esta enzima é restrita ao fígado e, em algumas espécies, os rins. Sendo assim, a betaína, vinda da dieta ou do catabolismo de colina, também é uma doadora do grupo metil (MUDD et al., 2007). A remetilação é regulada principalmente pela necessidade pelos grupos metil. Quando a ingestão destes grupos é generosa, a necessidade de remetilação é diminuída, o que direciona a homocisteína para seu catabolismo (BROSNAN et al., 2007).

O metabolismo da Met depende do estado de alimentação do animal (COURTNEY-MARTIN; BALL; PENCHARZ, 2012). A alimentação resulta em uma diminuição da liberação da Met para síntese proteica e aumento nas reações de transmetilação, transulfuração e remetilação. No estado de jejum, a relação é inversa, resultando na conservação de Met quando a disponibilidade dos SAA é baixa.

Os desafios inflamatórios também alteram esta demanda metabólica. Sob circunstâncias normais, a síntese de cisteína a partir de metionina pela via de transulfuração constitui uma fonte significativa deste AA. Nos seres humanos, tem sido demonstrado que a transulfuração da metionina representa 15 a 24% do fluxo de metionina dependendo do estado nutricional dos indivíduos e da composição da dieta (OBLED, 2003, p. 4).

2.5 Metabolismo da metionina no intestino delgado

O intestino delgado não é só responsável pela digestão e absorção dos nutrientes, mas também desempenha um papel importante no catabolismo de AA dietéticos (WU, 1998, p. 1). Estudos mostram que 20 a 97% dos AA ingeridos podem ser metabolizados pelo intestino delgado já na primeira passagem, sendo que menos de 20% são utilizados para a síntese da proteína da mucosa intestinal (WU, 2013, p. 46). Por isso, o conceito de digestibilidade proteica difere do conceito de biodisponibilidade da proteína dietética, que representa o resultado combinado da digestão, absorção e metabolismo da proteína e dos AA (WU, 2013, p. 35).

Mecanismos que envolvem o metabolismo dos AA na mucosa do intestino delgado desempenham papéis importantes na regulação da integridade intestinal. A Gln, o Glu e o aspartato provenientes da dieta, e a Gln arterial são os principais combustíveis para a mucosa intestinal e são responsáveis por fornecer energia necessária para os processos metabólicos dependentes de ATP tais como o transporte de nutrientes ativos e renovação celular. A ornitina, produto da Arg, Glu e da Pro, é uma precursora para a síntese de poliaminas, essenciais para a proliferação, diferenciação e reparação das células epiteliais intestinais. A arginina é precursora fisiológica do óxido nítrico (NO), que desempenha um papel importante na regulação do fluxo sanguíneo intestinal, na integridade celular, na secreção e na migração celular epitelial. O Glu, a Gli e a Cis são precursores da glutathione peroxidase, um tripeptídeo crítico para a defesa da mucosa intestinal contra danos tóxicos e oxidativos (WU, 1998, p. 3).

O TGI é responsável por altas taxas de transmetilação e transulfuração da Met dietética, já que existe uma grande demanda pela homocisteína e cisteína produzida através destas vias. O grupo metil produzido é necessário para a síntese de poliaminas, da glutathione peroxidase e de mucinas, produzidas pelas células caliciformes envolvidas na resposta imune inata (RIEDIJK et al., 2007).

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Em dietas para suínos, a DL-Met tem sido muito utilizada como fonte de suplementação de Met. Embora a D-Met geralmente seja eficaz, assim como a L-Met, para o desempenho de suínos, devido à conversão para a L-Met pelos rins e fígado, a D-Met não é utilizada diretamente pelas células do intestino delgado. A L-Met é a forma biologicamente funcional de Met, prontamente utilizada pelas células intestinais e, portanto, pode apresentar benefícios diretos para o trato gastrointestinal de suínos em fase de creche em comparação com a D-Met. Portanto, surge a hipótese de que a suplementação com L-Met teria melhores efeitos sobre o nível de GSH intestinal, o crescimento celular, o status oxidativo, e, conseqüentemente, no desenvolvimento intestinal e no desempenho de leitões em fase de creche quando comparados com a DL-metionina.

REFERÊNCIAS

- BAKER, D.H. Comparative species utilization and toxicity of sulfur amino acids. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1670S-1675S, 2006.
- BARBOSA, K.B.F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-642, 2010.
- BAUCHART-THEVRET, C.; STOLL, B.; BURRIN, D.G. Intestinal metabolism of sulfur amino acids. **Nutrition Research Reviews**, v. 22, p. 175-187, 2009.
- BERTECHINI, A.G. **Nutrição de Monogástricos**. Lavras, M.G.: Ed. UFLA, 2006. 301 p.
- BROSNAN, J.T. et al. Methionine: A metabolically unique amino acid. **Livestock Science**, v. 112, p. 2-7, 2007.
- BROSNAN, J.T.; BROSNAN, M.E. The Sulfur-Containing Amino Acids: An Overview. **The Journal of Nutrition**, v. 136, p. 1636S-1640S, 2006.
- CHEN, Y. et al. L-Methionine supplementation maintains the integrity and barrier function of the small-intestinal mucosa in post-weaning piglets. **Amino Acids**, v. 46, p. 1113-1142, 2014.
- CHUNG, T.K.; BAKER, D.H. Utilization of methionine isomers and analogs by the pig. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 72, p. 185-188, 1992.
- COURTNEY-MARTIN, G.; BALL, R.O.; PENCHARZ, P.B. Sulfur amino acid metabolism and requirements. **Nutrition Review**, v. 70, p. 170-175, 2012.
- CROMWELL, G. L. Identifying the limiting amino acids in complex and cereal grain-based diets to minimize nitrogen excretion. In: MIDWEST SWINE NUTR. CONF. PROC., 2004, Indianapolis. **Anais...** Columbus: The Ohio Univ. Press, 2004, p. 69-83.
- D'ANIELLO, A. et al. Biological role of D-amino acid oxidase and D-aspartate oxidase: Effects of d-amino acids. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 268, p. 1-2, 1993.
- D'ANIELLO, A.; D'Onofrio, G.; Pischetola, M. Total hydrolysis of proteins with strongly reduced racemization of amino acids. **Biochimica and Biofisica Acta**, v. 1037, n. 2, p. 200-208, 1993.
- D'MELLO, J.P.F. **Amino acids in animal nutrition**. 2nd ed. Cambridge, M.A.: CABI Publishing, 2003. 513 p.
- FANG, Z. et al. Methionine metabolism in piglets fed dl-methionine or its hydroxy analogue was affected by distribution of enzymes oxidizing these sources to keto-methionine. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2008-2014, 2010.

FINKELSTEIN, J.D. Methionine metabolism in mammals. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 1, p. 228-237, 1990.

HOEHLER, D.; RADEMACHER, M.; MOSENTHIN, R. Methionine Requirement and Commercial Methionine Sources in Growing Pigs. **Advances in Pork Production**, v. 16, 109-117, 2005.

KONG, C. et al. Relative bioavailability of dl-methionine compared with l-methionine fed to nursery pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 215, p. 181-185, 2016.

LE FLOC'H, N. et al. Towards amino acid recommendations for specific physiological and patho-physiological states in pigs. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 71, p. 425-432, 2012.

LEWIS, A.J. Methionine-Cystine Relationships in Pig Nutrition. In: D'MELLO, J.P.F. **Amino acids in animal nutrition**. 2nd ed. Cambridge, M.A.: CABI Publishing, 2003. cap. 8, p. 143-155.

LITVAK, N. et al. Immune system stimulation increases the optimal dietary methionine to methionine plus cysteine ratio in growing pigs. **Journal of Animal Science**, v. 91, p. 4188-4196, 2013.

MUDD, S.H., et al. Methyl balance and transmethylation fluxes in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 85, p. 19-25, 2007.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Nutrient requirements of swine**. 11th ed. Washington, D.C.: National Academy, 2012. 400 p.

NELSON, D.L.; COX, M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4th ed. New York, N.Y.: Freeman and Company, 2004.

OBLED, C. Amino acid requirements in inflammatory states. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 83, p. 365-373, 2003.

RAKSHANDEH, A. et al. Impact of immune system stimulation on the ileal nutrient digestibility and utilization of methionine plus cysteine intake for whole-body protein deposition in growing pigs. **British Journal of Nutrition**, v. 111, p. 101-110, 2014.

RIEDIJK, M.A. et al. Methionine transmethylation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, p. 3408-3413, 2007.

SHEN, Y.B.; WEAVER, A.C.; KIM, S.W. Effect of feed grade L-methionine on growth performance and gut health in nursery pigs compared with conventional DL-methionine. **Journal of Animal Science**, v. 92, p. 5530-5539, 2014.

TIAN, Q.Y. et al. Effect of l- or dl-methionine supplementation on nitrogen retention, serum amino acid concentrations and blood metabolites profile in starter pigs. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 29, n. 5, p. 689-694, 2016.

WU, G. **Amino acids: Biochemistry and nutrition**. New York, N.Y.: CRC Press, 2013. 482 p.

WU, G. Functional amino acids in growth, reproduction, and health. **Advances in Nutrition**, v. 1, p. 31-37, 2010.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**, v. 37, p. 1–17, 2009.

WU, G. Intestinal mucosal amino acid catabolism. **The Journal of Nutrition**, v. 128, p. 1249–1252, 1998.

WU, G. et al. Amino Acid nutrition in animals: protein synthesis and beyond. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 2, p. 387-417, 2014.

WU, G. et al. Functional amino acids in swine nutrition and production. In: Doppenberg, J.; van der Aar, P. **Dynamics in Animal Nutrition**. Wageningen, NL: Wageningen Acad, 2010. p. 69-98.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO 1

Desempenho e saúde intestinal de leitões suplementados com DL ou L-metionina na fase de creche

RESUMO

O trabalho foi realizado com o objetivo de investigar o desempenho e a saúde intestinal de leitões suplementados com L-Metionina (L-Met) em comparação com a DL-Metionina (DL-Met) na fase de creche. Foram utilizados 72 suínos (machos castrados e fêmeas) de alto valor genético, com peso inicial de $6,30 \pm 0,81$ kg e 25 d de idade (4 d pós-desmame), distribuídos aleatoriamente em 3 tratamentos, por 42 d: Dieta basal deficiente em Met (DB), DB + 0,06% de DL-Met) e DB + 0,06% de L-Met. A DB atendeu 66% da exigência de Met na fase pré-inicial e 71% na inicial, segundo o NRC (2012). As dietas DL-Met e L-Met atenderam 88% (pré-inicial) e 95% (inicial) das exigências de metionina. Os animais foram pesados individualmente e o fornecimento de ração por baia mensurado diariamente, com o objetivo de calcular as variáveis de desempenho: consumo de ração diário (CRD), ganho de peso diário (GPD), conversão alimentar (CA) e peso final (PF), considerando os valores de sobras de ração. Diariamente foi avaliada a incidência de diarreia, calculada através da porcentagem de baias com animais positivos para diarreia em relação ao total de observações realizadas no período. Aos 42 d de ensaio, um macho castrado por parcela experimental foi abatido e segmentos de jejuno foram coletados para avaliação da morfologia intestinal. Aos 43 d amostras de sangue do macho restante da parcela foram coletadas para avaliação da ureia plasmática. Do 0 aos 28 d de avaliação, a suplementação com L-Met aumentou o PF e o GPD, quando comparados com a DB. Ao final dos 42 d, os animais suplementados com DL-Met tiveram melhor GPD do que os animais que receberam a DB. Além disso, houve uma tendência de melhora no PF ($P = 0,065$), sendo que os animais do grupo DL-Met e L-Met tiveram um peso 4,85 e 6,63% maior do que o grupo DB, respectivamente. Do 0 aos 35 d, os animais suplementados com L-Met apresentaram uma menor incidência de diarreia, quando comparados com os grupos DB e DL-Met. Já no período total, o grupo L-Met apresentou menor incidência do que o grupo DL-Met. Os resultados de ureia plasmática e altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo:cripta do jejuno não foram diferentes entre os tratamentos. Como conclusão, a suplementação com L-Met aumenta o ganho de peso diário até os 28 dias de creche e a de DL-Met até os 42 dias de creche. A suplementação com L-Met reduz a incidência de diarreia durante a fase de creche.

Palavras-chave: desempenho, leitões desmamados, L-metionina, saúde intestinal

ABSTRACT

The aim of the study was to investigate the performance and intestinal health of piglets supplemented with L-Methionine (L-Met) compared to DL-Methionine (DL-Met) in the nursery phase. Seventy-two pigs (barrows and gilts) of high genetic value, with initial BW of 6.30 ± 0.81 kg and 25 d of age (4 d post-weaning), were randomly allocated in three treatments for 42 d: Basal diet deficient in Met (DB), DB + 0.06% of DL-Met and DB + 0.06% L-Met. DB contained 66% of the methionine requirement in pre-starter diet and 71% in the starter diet, according to NRC (2012). DL-Met and L-Met feeds contained 88% of the pre-starter diet and 95% of the starter diet requirement. The animals were weighed individually and the feed supply was measured daily per pen, for performance evaluation the variables considered were final BW, ADG, ADFI and feed conversion (FCR). Daily diarrhea incidence was performed, calculated as the percentage of positive pens for diarrhea related to the total period of observations carried out. At 42 d of trial, a barrow per pen was slaughtered and jejunum segments were collected for intestinal evaluation of morphology. At 43 d of the trial blood samples from the remaining barrow of the pen was collected for evaluation of plasma urea nitrogen (PUN). From 0 to 28 d of evaluation, L-Met supplementation increased final BW and ADG when compared to animals receiving DB. At the end of 42 days, animals supplemented with DL-Met had better ADG than animals receiving DB. In addition, there was a trend of improvement in the final BW ($P = 0.065$) and the animals of the DL-Met and L-Met groups had a greater BW of 4.85 and 6.63% respectively than the animals from DB group. From 0 to 35 d, animals supplemented with L-Met had a lower diarrhea incidence compared to animals from DB and DL-Met groups. For the total period, the animals of the L-Met group presented lower incidence than the animals of the DL-Met group. The results of PUN, villus height, crypt depth and villus:crypt ratio of the jejunum were not different between treatments. In conclusion, L-Met supplementation increases the average daily gain at 28 days of nursery phase and DL-Met at 42 days of nursery phase. L-Met supplementation reduces the diarrhea incidence during the nursery phase.

Key words: growth performance, gut health, methionine, nursery pigs

1 INTRODUÇÃO

A metionina (Met) é um AA essencial e geralmente o segundo ou terceiro AA limitante em dietas convencionais para suínos (Cromwell et al., 2004). Possui função direta na síntese de proteínas, assim como em outras funções biológicas, incluindo a doação do grupo metil (Finkelstein, 1990) e efeitos antioxidantes (Luo e Levine, 2009). Os vários papéis funcionais de Met são importantes para o desempenho e a saúde dos animais (Riedijk et al., 2007; Litvak et al., 2013; Shen et al., 2014). Desta forma, o balanceamento da ração com fontes de Met suplementares, a fim de gerar níveis adequados deste aminoácido, é uma prática comum.

Entre as principais fontes utilizadas está a DL-Met (99% de pureza), no entanto apenas a L-Met (99% de pureza) possui a configuração necessária para a síntese de proteínas, ativação celular e regulação metabólica. Os suínos convertem o isômero D-Metionina (D-Met) a L-Met com bastante eficiência (Baker, 2006), entretanto, como esta conversão acontece basicamente no fígado e nos rins (D'Aniello et al., 1990; Fang et al., 2010), a D-Met não é usada diretamente pelas células intestinais.

A L-Met é a forma biologicamente funcional da Met, sendo prontamente utilizada pelas células intestinais, podendo oferecer benefícios diretos para o trato gastrintestinal (TGI) de leitões em fase de creche (Shen et al., 2014). Ela atua na permeabilidade e no estado oxidativo do epitélio intestinal de leitões desmamados, podendo minimizar os prejuízos causados pela síndrome da diarreia pós-desmame (Chen et al., 2014). No entanto, os dados sobre a comparação de L-Met contra a DL-Met nesta fase ainda são limitados, principalmente para diarreia.

Com isso, o objetivo com este trabalho foi investigar o desempenho e a incidência de diarreia, morfometria e ureia plasmática de leitões suplementados com L-Met em comparação com a DL-Met na fase de creche.

2 MATERIAL E MÉTODOS

Todos os procedimentos experimentais para esse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sob o protocolo 003/16.

2.1 Animais, instalações e delineamento experimental

O experimento foi conduzido no Centro Experimental de Suínos (CES) do Departamento de Zootecnia (DZO) da UFLA, no município de Lavras, Minas Gerais. Foram utilizados 72 suínos (machos castrados e fêmeas), de uma linhagem comercial de alto valor genético, com 25 d de idade (4 d pós-desmame) e $6,30 \pm 0,81$ kg de peso inicial. Os animais foram alojados em duas salas de creche com baias suspensas, comedouro tipo calha e bebedouro tipo chupeta.

O delineamento experimental utilizado foi em blocos casualizados, com base no peso inicial, totalizando três tratamentos e oito repetições. Foram utilizados 3 animais por parcela experimental (dois machos castrados e uma fêmea). Os tratamentos constituíram-se em uma dieta basal (DB) deficiente em Met, DB + 0,06% de DL-Met e DB + 0,06% de L-Met.

2.2 Dietas experimentais

As dietas foram formuladas para atender as exigências sugeridas pelo NRC (2012), exceto para a Met (Tabela 1). A Met digestível da DB, nas fases pré-inicial e inicial, foram de 0,271% (66% da exigência) e 0,256% (71% da exigência), respectivamente. Os tratamentos DL-Met e L-Met atenderam 80% (pré-inicial) e 87% (inicial) das exigências das fases. O ensaio teve a duração de 42 d e os animais receberam ração e água *ad libitum*.

Tabela 1 – Dietas basais nas fases pré-inicial e inicial*

Ingrediente	Pré-inicial	Inicial
Milho moído	43,388	64,308
Soja micronizada	10,327	4,760
Farelo de soja 46%	16,000	25,000
Plasma spray dried	3,000	-
Óleo de soja refinado	-	1,233
Prius L70 ¹	12,500	-
Star Pro 25 ²	10,000	-
Premix vitamínico ³	0,400	0,400
Premix mineral ⁴	0,100	0,100
Fosfato bicálcico	0,874	1,231
Calcário Calcítico	0,933	0,785
Sal comum	0,317	0,457
Óxido de zinco 72%	0,340	0,260
L-Lisina 54,6%	0,497	0,543
L-Treonina 94,9%	0,162	0,218
L-Triptofano 99,0%	0,093	0,093
L-Valina 96,5%	0,069	0,112
Caulim	1,000	0,500
Valores calculados	Pré-inicial	Inicial
Energia Metabolizável (kcal/kg)	3400	3350
Proteína Bruta (%)	21,73	19,06
Lisina digestível (%)	1,425	1,280
Metionina digestível (%)	0,271	0,256
Met + Cis digestível (%)	0,608	0,525
Treonina digestível (%)	0,916	0,823
Triptofano digestível (%)	0,32	0,287
Lactose (%)	12,812	-
Cálcio (%)	0,825	0,700
Fósforo disponível (%)	0,425	0,330
Sódio (%)	0,375	0,200

*Pré-inicial: 0 aos 20 dias; Inicial: 21 aos 42 dias. ¹Produto comercial com 70,50% de lactose. ²Produto comercial com 40,00% de lactose. ³Premix vitamínico contendo por kg do produto: Colina: 100g; Vitamina A: 2.750U.I.; Vitamina D: 625U.I.; Vitamina E: 18.400mg; Vitamina K: 1.250mg; Vitamina B1: 640mg; Vitamina B2: 1.550mg; Vitamina B6: 1.050mg; Vitamina B12:4.010mg; Niacina: 10.600mg; Ácido pantotênico: 6.250mg; Ácido fólico: 225mg; Biotina: 51.000mcg; Vitamina C: 5.000mg. ⁴Premix mineral contendo por kg do produto: Cobalto: 0,15mg; Cobre: 7mg; Ferro: 40mg; Iodo: 0,75mg; Mangânes: 2,5g; Zinco: 60mg; Selênio:138mg.

2.3 Procedimentos experimentais

A monitoria da temperatura e umidade relativa foi realizada duas vezes ao dia, utilizando um termômetro de globo negro e um termohigrômetro por sala, mantidos entre as baias a uma altura correspondente à meia altura dos animais. Os valores registrados foram utilizados no cálculo do índice de temperatura de globo e umidade (ITGU), segundo Buffington et al. (1981), caracterizando o ambiente térmico que os animais foram mantidos.

Após o desmame e a chegada às instalações, os leitões passaram por um período de adaptação de quatro dias e foram alimentados com uma dieta pré-inicial comum a todos, seguindo as recomendações do NRC (2012) para a fase. Após o período, os animais foram pesados e este foi considerado o dia 0 do experimento. Os animais também foram pesados individualmente nos dias 7, 14, 21, 28 e 42 de experimento e o fornecimento de ração mensurado por baia diariamente, com o objetivo de calcular as variáveis de desempenho CRD, GPD, CA e PF, considerando os valores de sobras de ração. Diariamente foi realizada a incidência de diarreia através da técnica de Casey et al. (2007). Esta foi realizada por apenas uma pessoa e calculada através da porcentagem de baias com animais positivos para diarreia em relação ao total de observações realizadas no período.

2.4 Colheita de amostras e processamentos

Aos 42 d foi abatido um macho castrado por parcela experimental, com o peso mais próximo do peso médio da baia, totalizando 56 animais. O abate foi realizado através de insensibilização por eletronarcolese seguida de exsanguinação e foi realizado em um frigorífico comercial no município de Lavras, acompanhado por um médico veterinário.

Após a evisceração, foram colhidas amostras de cerca de três centímetros de comprimento do jejuno para realização de análises histológicas (altura de vilosidades, profundidade de cripta e relação vilo:cripta).

2.5 Morfologia intestinal

Após cuidadosa remoção do conteúdo luminal e lavagem com solução salina, as amostras de jejuno foram fixadas em formol 10%, por 24 horas, e transferidas para solução em álcool 70°

até a fabricação das lâminas. A análise histológica foi realizada nos segmentos embebidos em parafina, seccionadas a 4 μ m e coradas com hematoxilina e eosina, baseado em Luna (1968). As lâminas foram fotografadas através do microscópio trinocular (CX31, Olympus Optical do Brasil Ltda., São Paulo, SP) e câmera de captura de imagens digitais (SC30, Olympus Optical do Brasil Ltda., São Paulo, SP). A altura das vilosidades e a profundidade das criptas foram medidas através do programa AxionVision SE64 4.9.1, utilizando 10 vilosidades e criptas bem orientadas. A relação vilo:cripta foi calculada, sendo que as análises foram realizadas por uma única pessoa.

2.6 Ureia plasmática

No 43º dia de experimento, após 10 horas de jejum alimentar, foi colhida uma amostra de sangue do macho castrado restante na baia, para determinação de ureia plasmática. As amostras de sangue foram obtidas a partir da veia jugular, utilizando tubos de 10 ml sem anticoagulante. O plasma foi obtido após centrifugação a 1500 x g por 10 min. As concentrações de ureia plasmática foram determinados utilizando kit comercial (Stanbio Laboratory, Boeme, TX).

2.7 Análises estatísticas

Os dados foram analisados em blocos casualizados, considerando a baia como parcela experimental para as médias de CRD e CA e o animal para as médias de GPD e PF, utilizando o procedimento MIXED do pacote estatístico SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC). O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para analisar a normalidade dos dados e, quando estes não apresentaram essa distribuição, foi realizada a transformação usando PROC RANK (SAS INSTITUTE INC, 2009). Todas as variáveis foram submetidas à análise de variância, exceto a incidência de diarreia. Quando houve diferença estatística pelo teste F ($F < 0,05$), foi adotado o teste de Tukey para comparação das médias, considerando diferença significativa o P-valor $< 0,05$ e tendência $0,05 \leq$ P-valor $< 0,10$. Na variável incidência de diarreia, foi analisada a influência de cada tratamento na ocorrência de diarreia, através da aplicação do modelo linear generalizado binomial no procedimento GENMOD.

3 RESULTADOS

As temperaturas máxima e mínima e o ITGU calculado, durante a avaliação estão detalhadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Temperaturas mínima e máxima, em °C, e valor do ITGU durante o estudo na fase de creche

Fases	Temperaturas		ITGU
	Mínima	Máxima	
Pré-inicial	21,9 ± 2,2	27,4 ± 1,4	71,37 ± 3,39
Inicial	18,7 ± 2,7	24,8 ± 1,4	68,67 ± 3,40

Os valores de temperatura e ITGU representam que os animais estavam em um ambiente térmico confortável e dentro da sua zona de termoneutralidade (Ferreira, 2000) e não foram considerados como um fator de interferência nos resultados do ensaio.

3.1 Desempenho

Os resultados de CRD, GPD, CA e PF, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 – Consumo de ração diário (CRD), ganho de peso diário (GPD), conversão alimentar (CA) e peso final (PF) de leitões suplementados com DL-Met e L-Met na fase de creche, comparados a uma dieta basal*

Variáveis	Tratamentos			CV, %	P-valor
	DB	DL-Met	L-Met		
Peso inicial	6,303	6,302	6,300	13,01	0,999
0-7 dias					
CRD, kg	0,318	0,340	0,323	15,75	0,679
GPD, kg	0,233	0,254	0,275	26,48	0,095
CA	1,279	1,347	1,189	16,27	0,361
PF, kg	8,001	7,980	8,235	11,81	0,222
0-14 dias					
CRD, kg	0,412	0,470	0,448	13,57	0,160
GPD, kg	0,280	0,317	0,320	22,73	0,087
CA	1,386	1,508	1,417	15,48	0,564
PF, kg	10,317	10,733	10,785	12,23	0,194
0-21 dias					
CRD, kg	0,500	0,569	0,548	13,54	0,170
GPD, kg	0,342	0,368	0,384	17,93	0,056
CA	1,393	1,527	1,440	13,79	0,408
PF, kg	13,586	14,025	14,257	11,74	0,187
0-28 dias					
CRD, kg	0,595	0,676	0,629	14,33	0,221
GPD, kg	0,380b	0,420ab	0,437a	16,65	0,005
CA	1,590	1,605	1,447	16,82	0,471
PF, kg	17,075b	18,018ab	18,525a	12,52	0,014
0-42 dias					
CRD, kg	0,768	0,856	0,809	10,59	0,131
GPD, kg	0,447b	0,491a	0,482ab	13,46	0,039
CA	1,754	1,759	1,809	13,88	0,876
PF, kg	25,076	26,292	26,739	10,37	0,065

*Médias na linha, seguidas por letras minúsculas distintas, diferem pelo teste de Tukey com $P < 0,05$.

Do 0 aos 28 d de avaliação, a suplementação com L-Met aumentou o PF e o GPD dos leitões, quando comparados com os animais que receberam a DB. Ao final dos 42 dias, os animais suplementados com DL-Met tiveram melhor GPD do que os animais que receberam a DB. Além disso, houve uma tendência de melhora no PF ($P = 0,065$) dos animais suplementados, sendo que os animais do grupo DL-Met e L-Met tiveram um peso 4,85 e 6,63% maior do que o grupo DB, respectivamente.

3.2 Incidência de diarreia

Os resultados de incidência de diarreia estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 – Incidência de diarreia (ID), em %, de leitões suplementados com DL-Met e L-Met na fase de creche, comparados a uma dieta basal

Variáveis	Tratamentos			P-valor
	DB	DL-Met	L-Met	
ID 0 a 7	21,428a	26,786a	5,357b	0,001
ID 0 a 14	13,393a	15,179a	3,571b	0,003
ID 0 a 21	10,119a	12,500a	3,571b	0,008
ID 0 a 28	8,482ab	10,268a	4,018b	0,065
ID 0 a 35	7,500a	8,572a	3,214b	0,033
ID 0 a 41	6,707ab	8,232a	3,354b	0,012

Do 0 aos 35 d, os animais suplementados com L-Met apresentaram uma menor incidência de diarreia, quando comparados com os grupos DB e DL-Met. Já no período total (0 aos 41 d) o grupo L-Met apresentou menor incidência do que o grupo DL-Met.

3.3 Ureia plasmática

As concentrações de ureia plasmática não foram diferentes entre os animais suplementados quando comparados com os que receberam a dieta basal ou entre si (Tabela 5).

Tabela 5 – Ureia plasmática, em mg/dL, de leitões suplementados com DL-Met e L-Met na fase de creche, comparados a dieta basal

	Tratamentos			CV, %	P-valor
	DB	DL-Met	L-Met		
Ureia plasmática*	19,33	17,50	13,29	33,72	0,201

*Jejum alimentar de 10 horas.

3.4 Morfologia intestinal

Como descrito na Tabela 6, os tratamentos não resultaram em diferenças na altura de vilosidade, profundidade de cripta e relação vilo:cripta nos animais avaliados.

Tabela 6 – Morfometria do jejuno, em μm , de leitões suplementados com DL-Met e L-Met na fase de creche, comparados a dieta basal

Variáveis	Tratamentos			CV, %	P-valor
	DB	DL-Met	L-Met		
Altura de vilosidade	461,00	541,98	424,56	27,85	0,225
Profundidade de cripta	415,40	458,77	477,36	12,06	0,190
Relação vilo:cripta	1,12	1,17	0,91	27,52	0,247

4 DISCUSSÃO

Assim como encontrado por Shen et al. (2014) e Chen et al. (2014), a suplementação com Met melhorou o desempenho de leitões de creche. A Met é um AA que desempenha papéis únicos, tanto na estrutura como no metabolismo de proteínas (Brosnan et al., 2007; Rakhshandeh et al., 2014). É transmetilada intracelularmente a homocisteína através de S-adenosilmetionina (SAM), um importante doador de grupo metil para a maioria das reações de metilação (Riedijk et al., 2007). A SAM desempenha um papel fundamental na regulação da expressão gênica, fazendo da Met o AA de início da síntese proteica (Brosnan and Brosnan, 2006). Também é reconhecida por ser precursora de moléculas essenciais, tais como a cisteína, as poliaminas e a enzima glutathione peroxidase (GSH), que participa na regulação do epitélio intestinal em situações de estresses oxidativos, contribuindo positivamente para o crescimento da mucosa intestinal e a manutenção da sua função (Chen et al., 2014). Considerando o estresse oxidativo que o desmame gera no TGI dos leitões, o efeito antioxidante da Met pode ter atuado no seu desenvolvimento, resultando em melhora de desempenho.

Quantidades adequadas de Met devem ser fornecidas através das dietas para otimizar o desempenho dos suínos (Opapeju et al., 2012). Alguns trabalhos autores demonstram que a deficiência dos AA sulfurados diminui o ganho de peso dos animais avaliados (Conde-Aguilera et al., 2010; Kino and Okumura, 1986) e essa redução é causada principalmente pela redução da síntese proteica. O aumento no GPD e PF apresentados pelos animais suplementados com L-Met, aos 28 dias de avaliação, sugerem estar associados com todas estas funções desempenhadas pela Met.

Nos primeiros 28 dias do ensaio, o PF e o GDP dos leitões suplementados com L-Met foram superiores ao dos animais que receberam a DB, mas similar aos dos leitões que receberam a DL-Met. Estes resultados diferem de Shen et al. (2014), que encontraram um maior GPD e uma melhor eficiência alimentar em leitões de 26 a 31 dias de idade suplementados com L-Met, quando comparados com a DL-Met. Da mesma forma, Reifsnnyder, Young e Jones (1984), usando leitões recém-desmamados, demonstraram que os leitões alimentados com L-Met tiveram uma melhora na eficiência alimentar em comparação com os leitões suplementados com a DL-Met. A utilização dos isômeros de Met pode variar de acordo com a idade (Shen et al., 2014). Animais mais jovens possuem uma produção menor de D-AA oxidase, tornando a transaminação ineficiente e reduzindo

a biodisponibilidade da D-Met (D’Aniello et al., 1993). Chung e Baker (1992) obtiveram resultados semelhantes ao PF no período total deste trabalho, indicando que a DL-Met foi tão eficiente quanto a L-Met na melhora do GPD e eficiência alimentar, utilizando leitões em fase final de creche, assim como em Cho et al. (1980).

A diarreia pós-desmame é uma condição comum na produção suína, devido aos diversos fatores estressantes associados ao período (Pluske, 2013). Entretanto, os leitões suplementados com L-Met apresentaram menor incidência de diarreia durante toda a fase de creche. A L-Met melhora a barreira intestinal de leitões no pós-desmame, aumentando a expressão de proteínas das *tight junction*, e alivia lesões intestinais associadas ao estresse oxidativo e aumento de apoptose que ocorrem neste período (Chen et al., 2014). A menor incidência de diarreia apresentada pelos animais suplementados com L-Met possivelmente resultou no maior desempenho apresentado pelo grupo nos primeiros 28 dias.

Diferentemente do achado neste trabalho, Shen et al. (2014) encontraram concentrações menores de ureia plasmática em leitões suplementados com DL e L-Met, quando comparados a uma dieta deficiente, tanto aos 10 como aos 20 dias de avaliação. Ao comparar as duas fontes, apenas aos 10 dias a concentração foi maior para os animais do grupo DL-Met. A biodisponibilidade relativa (RBA) da L-Met, calculadas a partir destes valores de ureia nas diferentes idades, foram inconsistentes, indicando que a utilização dos isômeros da Met varia em função da idade dos animais.

Em várias espécies, incluindo a suína, a concentração de ureia plasmática pode ser utilizada para quantificar as taxas de utilização e excreção de nitrogênio (Kohn et al., 2005), sendo que altas concentrações indicam baixa utilização da proteína dietética (Waguespack et al., 2011). Os resultados deste estudo sugerem que os AA obtidos na dieta foram utilizados de forma adequada e suficientes para a síntese proteica, já que os níveis estão dentro da faixa de 10 a 30 mg/dL, considerada normal para os suínos (Kaneko et al., 1997). Além disso, os consumos diários de Met e Met + Cis, de todos os grupos avaliados, foram bem próximos do preconizado pelo NRC (2012), justificando a normalidade das concentrações de ureia plasmática.

Ao contrário deste trabalho, que não apresentou diferenças na morfometria do jejeuno nos leitões avaliados, estudos anteriores demonstraram que dietas livres de AA sulfurados levam a menor desenvolvimento da mucosa intestinal, com atrofia das vilosidades, reduzida proliferação das células epiteliais e um menor número de células caliciformes (Bauchart-Thevert et al. 2009).

Chen et al. (2014) encontraram aumento na altura das vilosidades do jejuno, menor profundidade de cripta do duodeno e melhor relação vilo:cripta no duodeno, jejuno e íleo em leitões suplementados com L-Met quando comparados com animais que receberam uma dieta deficiente em Met. Shen et al. (2014) encontraram melhora na morfologia (altura e diâmetro) das vilosidades do duodeno em leitões suplementados com L-Met, sugerindo que a L-Met tem maiores efeitos no desenvolvimento intestinal do que a DL-Met. Frangos suplementados com as duas fontes tiveram resultados semelhantes aos 21 dias de idade (Shen et al., 2015).

Como outros aminoácidos sulfurados, a Met afeta diretamente o metabolismo das proteínas no intestino delgado. Em torno de 20% da ingestão diária de Met é metabolizada ainda no TGI (Riedijk et al., 2007). Ele é responsável por altas taxas de transmetilação e transulfuração da Met dietética, já que existe uma grande demanda pela homocisteína e cisteína produzida através destas vias. O grupo metil produzido é necessário para a síntese de poliaminas, da GSH e de mucinas, produzidas pelas células caliciformes envolvidas na resposta imune inata (Shoveller et al., 2005). Desta forma, níveis adequados de Met são nutricionalmente essenciais para manter o crescimento da mucosa normal em leitões no pós-desmame. O CRD de todos os grupos avaliados foi acima do sugerido pelo NRC (2012), resultando em um consumo diário de Met e Met + Cis bem próximo do preconizado para a fase, mesmo na DB. A semelhança dos resultados da morfometria pode ter sido causada pela adequada condição nutricional da mucosa intestinal, gerada pelo alto consumo de ração.

5 CONCLUSÕES

A suplementação com L-Metionina aumenta o ganho de peso diário até os 28 dias de creche e a de DL-Metionina até os 42 dias de creche. A suplementação com L-Met reduz a incidência de diarreia durante a fase de creche.

REFERÊNCIAS

- Baker, D. H. 2006. Comparative species utilization and toxicity of sulfur amino acids. *J. Nutr.* 136:1670S–1675S.
- Bauchart-Thevert C., B. Stoll, and D. G. Burrin. 2009. Intestinal metabolism of sulfur amino acids. *Nutr Res Rev* 22:175–187. doi:10.1017/S09544224 09990138
- Brosnan J. T., and M. E. Brosnan. 2006. The sulfur-containing amino acids: an overview. *J. Nutr.* 136: 1636S–1640S.
- Brosnan J. T., M. E. Brosnan, R. F. P. Bertolo, and J. A. Brunton. 2007. Methionine: a metabolically unique amino acid. *Livest. Sci.* 122:2–7. doi: 10.1016/j.livsci.2007.07.005
- Buffington, D. E., A. Collazo-Arocho, G. H. Canton, and D. Pitt. 1981. Black globe-humidity index (BGHI) as comfort equation for dairy cows. *Transactions of the ASAE* 24 (3):711-714.
- Casey, P. G. G. E. Gardiner, G. Casey, B. Bradshaw, P. G. Lawlor, P. B. Lynch, F. C. Leonard, C. Stanton, R. P. Ross, G. F. Fitzgerald, and C. Hill. 2007. A five-strain probiotic combination reduces pathogen shedding and alleviates disease signs in pigs challenged with *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 73 (6):1858-1863. doi:10.1128/AEM.01840-06
- Chen, Y., D. Li, Z. Dai, X. Piao, Z. Wu, B. Wang, Y. Zhu, and Z. Zeng. 2014. L-Methionine supplementation maintains the integrity and barrier function of the small-intestinal mucosa in post-weaning piglets. *Amino Acids* 46:1113-1142. doi: 10.1007/s00726-014-1675-5.
- Cho, E. S., D. W. Andersen, L. J. Filer Jr., and L. D. Stegink. 1980. D-methionine utilization in young miniature pigs, adult rabbits, and adult dogs. *JPEN J. Parenter. Enteral. Nutr.* 4:544–547.
- Chung, T. K., and D. H. Baker. 1992. Utilization of methionine isomers and analogs by the pigs. *Can. J. Anim. Sci.* 72:185–188.
- Conde-Aguilera J.A., R. Barea, N. Le Floc’h, L. Lefaucheur, and J. van Milgen. 2010. A sulfur amino acid deficiency changes the amino acid composition of body protein in piglets. *Animal* 4:1349–1358. doi:10.1017/S1751731110000340
- Cromwell, G. L. 2004. Identifying the limiting amino acids in complex and cereal grain-based diets to minimize nitrogen excretion. In: *Midwest Swine Nutr. Conf. Proc.*, Indianapolis, IN. The Ohio Univ. Press, Columbus, OH. p. 69–83.
- D’Aniello, A., G. D’Onofrio, M. Pischetola. 1990. Total hydrolysis of proteins with strongly reduced racemization of amino acids. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1037:200-208.

- D’Aniello, A., G. D’Onofrio, M. Pischetola, G. D’Aniello, A. Vetere, L. Petrucelli, and G. H. Fisher. 1993. Biological role of d-amino acid oxidase and d-aspartate oxidase. Effects of d-amino acids. *J. Biol. Chem.* 268:26941–26949.
- Fang, Z., H. Luo, H. Wei, F. Huang, Z. Qi, S. Jiang, and J. Peng. 2010. Methionine Metabolism in Piglets Fed DL-Methionine or Its Hydroxy Analogue Was Affected by Distribution of Enzymes Oxidizing These Sources to Keto-Methionine. *J. Agric. Food Chem.* 58:2008–2014. doi:10.1021/jf903317x.
- Ferreira, R. 2000. Efeitos do clima sobre a nutrição de suínos. In: *Encontros técnicos ABRAVES, Chapecó, SC. Embrapa Aves e Suínos: Concórdia.* p. 1-15.
- Finkelstein, J. D. 1990. Methionine metabolism in mammals. *J. Nutr. Biochem.* 1:228–237.
- Kaneko, J. J., J. W. Harvey, and M. L. Bruss. 1997. *Clinical biochemistry of domestic animals.* 5th ed. Academic Press, San Diego, CA.
- Kino K, and J. Okumura. 1986. The effect of single essential amino acid deprivation on chick growth and nitrogen and energy balance at ad libitum- and equalized-food intakes. *Poult Sci* 65:1728–1735.
- Kohn, R.A., M. M. Dinneen, and E. Russek-Cohen. 2005. Using blood urea nitrogen to predict nitrogen excretion and efficiency of nitrogen utilization in cattle, sheep, goats, horses, pigs, and rats. *J. Anim. Sci.* 83(4):879–889.
- Litvak, N., A. Rakhshandeh, J. K. Htoo, and C. F. M. de Lange. 2013. Immune system stimulation increases the optimal dietary methionine to methionine plus cysteine ratio in growing pigs. *J. Anim. Sci.* 91:4188-4196.
- Luna, L.G. 1968. *Manual of histologic staining methods of the armed forces institute of pathology.* 3rd ed. McGraw-Hill Press, New York. NY.
- Luo, S., and R. L. Levine. 2009. Methionine in proteins defends against oxidative stress. *FASEB J.* 23:464–472. doi:10.1096/fj.08-118414.
- NRC. 2012. *Nutrient requirements of swine.* 11th ed. Natl. Acad. Press, Washington, DC.
- Opapeju F. O., J. K. Htoo, C. Dapoza, and C. M. Nyachoti. 2012. Bioavailability of methionine hydroxy analog-calcium salt relative to DL-methionine to support nitrogen retention and growth in starter pigs. *Animal* 6:1750–1756 doi:10.1017/S1751731112000869
- Pluske, J. P. 2013. Feed- and feed aditives-related aspects of gut health and development in weanling pigs. *J. Anim. Sci. and Biotech.* 4:1-7. doi:10.1186 /2049-1891-4-1
- Rakhshandeh, A., J. K. Htoo, N. Karrow, S. P. Miller, and C. F. M. de Lange. 2014. Impact of immune system stimulation on the ileal nutrient digestibility and utilization of methionine plus

cysteine intake for whole-body protein deposition in growing pigs. *British Journal of Nutrition* 111:101-110. doi:10.1017/S0007114513001955

Reifsnnyder, D. H., C. T. Young, and E. E. Jones. 1984. The use of low protein liquid diets to determine the methionine requirement and the efficacy of methionine hydroxy analogue for the three-week-old pig. *J. Nutr.* 114:1705-1715.

Riedijk, M. A., B. Stoll, S. Chacko, H. Schierbeek, A. L. Sunehag, J. B. van Goudoever, and D. G. Burrin. 2007. Methionine transmethylation and transsulfuration in the piglet gastrointestinal tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:3408–3413. doi_10.1073_pnas.0607965104

SAS INSTITUTE INC. SAS user's guide: statistics. Cary, 2009. (Version 9.3).

Shen, Y. B., A. C. Weaver, and S.W. Kim. 2014. Effect of feed grade L-methionine on growth performance and gut health in nursery pigs compared with conventional DL-methionine. *J. Anim. Sci.* 92:5530-5539. doi: 10.2527/jas2014-7830

Shen, Y. B., P. Ferket, I. Park, R. D. Malheiros, and S. W. Kim. 2015. Effects of feed grade L-methionine on intestinal redox status, intestinal development, and growth performance of young chickens compared with conventional DL-methionine *J. Anim. Sci.* 93:2977–2986. doi:10.2527/jas2015-8898

Shoveller A. K., B. Stoll, R. O. Ball, and D. G. Burrin. 2005. Nutritional and functional importance of intestinal sulfur amino acid metabolism. *J. Nutr.* 135:1609–1612.

Waguespack A.M., S. Powell, M. L. Roux, E. D. Frugé, T. D. Bridner, R. L. Payne, and L. L. Southern. 2011. Technical note: Effect of determining base line plasma urea nitrogen concentrations on subsequent post treatment plasma urea nitrogen concentrations in 20 to 50 kilogram pigs. *J. Anim. Sci.* 89(12): 4116–4119. doi:10.2527/jas.2011-4328